

- For more records, click the Records link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click **Display Selected**.
- To print/save clean copies of selected records from browser click **Print/Save Selected**.
- To have records sent as hardcopy or via email, click **Send Results**.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All	Format	
<input checked="" type="checkbox"/> Clear Selections	Print/Save Selected	Send Results
Display Selected	Full	

1. ☒ 21/19/1

007645714 **Image available**
 WPI Acc No: 1988-279646/198840
 XRAM Acc No: C88-124469

**Undenatured collagen prepn. from tendons or cutis -
 non-denatured collagen prepn. from tendons or cutis**

Patent Assignee: IST GENTILI SPA (GEOA); EURORESEARCH SRL (EURO-N)

Inventor: MENICAGLI C

Number of Countries: 016 Number of Patents: 010

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 284789	A	19881005	EP 88102975	A	19880229	198840 B
JP 1006300	A	19890110	JP 8856878	A	19880310	198907
US 4894441	A	19900116	US 88163531	A	19880303	199010
IT 1214505	B	19900118				199203
EP 284789	B1	19931006	EP 88102975	A	19880229	199340
CA 1322166	C	19930914	CA 561065	A	19880310	199343
DE 3884645	G	19931111	DE 3884645	A	19880229	199346
			EP 88102975	A	19880229	
ES 2059414	T3	19941116	EP 88102975	A	19880229	199501
JP 2886164	B2	19990426	JP 8856878	A	19880310	199922
JP 11246598	A	19990914	JP 8856878	A	19880310	199948
			JP 98320518	A	19880310	

Priority Applications (No Type Date): IT 8719659 A 19870312

Cited Patents: 00 23200; 2328786

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
EP 284789	A	E	9		

Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

US 4894441 A 7

EP 284789 B1 E 18 C08H-001/06

Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

DE 3884645 G C08H-001/06 Based on patent EP 284789

ES 2059414 T3 C08H-001/06 Based on patent EP 284789

JP 2886164 B2 5 C07K-014/78 Previous Publ. patent JP 1006300

JP 11246598 A 5 C07K-014/78 Div ex application JP 8856878

CA 1322166 C C07K-015/06

Abstract (Basic): EP 284789 A

Undenatured collagen is prepd. from tendons or cutis by (a) extn. of the biological tissue with dil. organic acid, (b) pptn. of the collagen by addn. of inorganic salts, (c) opt., gelation with dil. organic acids, (d) tangential filtration through membranes with appropriate mol. cut-off, and (e) opt. lyophilisation of the final soln. or gel.

USE/ADVANTAGE - Use of the collagen in pharmacy is claimed. Spongy tablets of lyophilised collagen from bovine tendons, opt. contg. cpds. with pharmacological activity, esp. tablets contg. ZnSO4 for use in gynaecology, are claimed. Other additives include antibiotics, vitamins, hormones and steroids. Collagen is used in surgery, in

THIS PAGE BLANK (USPTO)

treatment of burns, as surgical prosthesis (e.g. suture threads or gauzes), as implant material, and in pharmaceutical and cosmetic creams and ointments. The collagen does not cause allergies, and is more effective in healing than collagens obtd. by other processes. This process is economical.

0/4

Abstract (Equivalent): EP 284789 B

A process for the preparation of undenatured collagen from bovine tendons comprising the following steps: (a) extraction of the biologic tissue with 0.5 to 2 M aqueous acetic acid, (b) precipitation of the collagen by addition of inorganic salts and recovering of the precipitate; (c) suspension of precipitate in 0.5 to 2 M aqueous acetic acid and stirring until gelation; (d) repetition of the above steps (b) and (c); (e) washing and optionally concentrating of the solution or gel by tangential filtration through membranes having an exclusion limit from 10,000 to 100,000; (f) lyophilisation of the final solution or gel to prepare spongy tablets.

Dwg.1/4

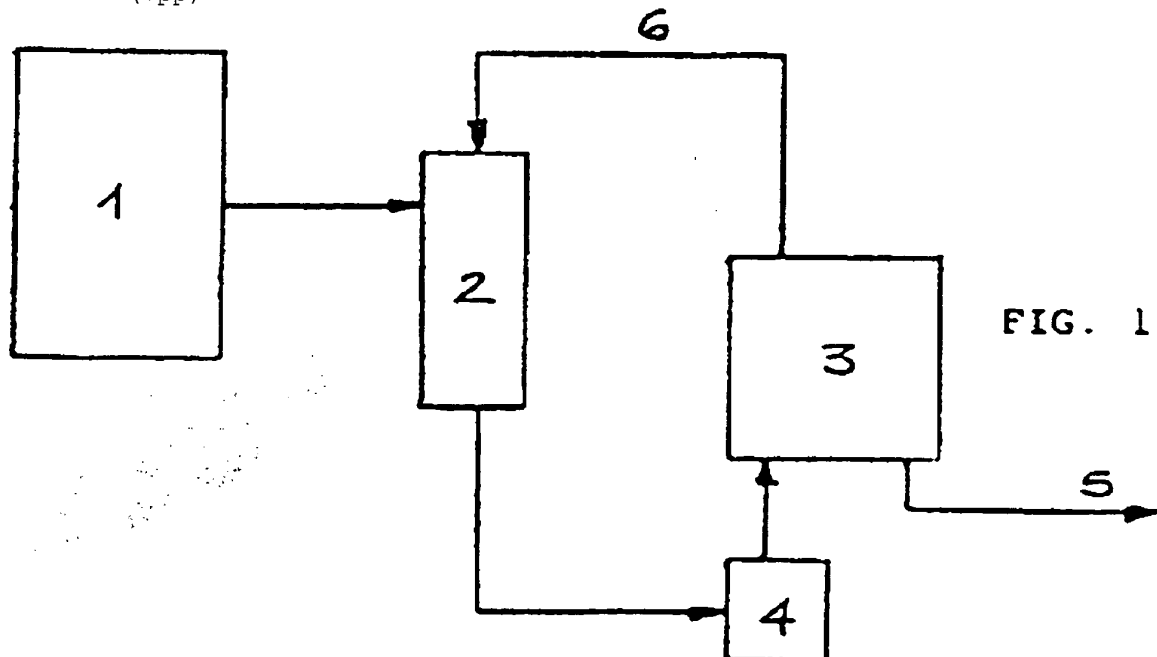
Abstract (Equivalent): US 4894441 A

Prodn. of very pure collagen comprises disintegration of bovine tendons (100 pts. wt.); dispersion with aq. HOAc (0.5-2.0 mol/dm³; 10-100 pts. wt.) and mild agitation of the suspension for 24-27 h at temps. not above 25 C; sepn. of the acidic extract; pptn.

of crude collagen by addn. of NaCl; sepn. of the liquors from the sticky white threads; dispersion of the crude collagen with aq.

HOAc (0.5 mol/dm³); dilution of the resulting gel (to collagen concn. 0.005-0.5 wt.%); dialysis with a membrane which excludes material with Mr 104-105 but passes solutes with lower Mr; recovery of the purified collagen; and freeze-drying. USE - The prod. is free from denatured material and has the triple helix structure of natural collagen, and is suitable for surgery, burns, prosthetics, implants, or pharmaceutical and cosmetic creams.

(7pp)



Title Terms: COLLAGEN; PREPARATION; TENDON; CUTIS; NON; DENATURE; COLLAGEN; PREPARATION; TENDON; CUTIS

THIS PAGE BLANK (US)

*Derwent Class: B04; D21; D22; P34
International Patent Class (Main): C07K-014/78; C07K-015/06; C08H-001/06
International Patent Class (Additional): A01N-063/02; A61K-009/02;
A61K-009/20; A61K-037/12; A61K-038/22; A61K-047/42; A61L-027/00;
B01D-013/00; C07G-007/00; C07J-000/00; C07K-001/30; C07K-001/34;
C07K-001/36; C07K-003/02; C07K-015/20
File Segment: CPI; EngPI
Manual Codes (CPI/A-N): B04-B04A6; B11-C04A; B12-A07; B12-L02; D08-B;
D08-B09A; D09-C01; D09-D
Chemical Fragment Codes (M1):
01 M423 M431 M720 M782 M903 N161 N421 P942 P943 Q254 R038 R042 R044
R046 V752
Chemical Fragment Codes (M2):
02 A430 A940 C108 C316 C540 C730 C801 C802 C803 C804 C805 M411 M431
M782 M903 M904 M910 P942 P943 Q254 R038 R044 R046 R01741-M
Chemical Fragment Codes (M6):
03 M903 P942 P943 Q254 R038 R042 R044 R046 R111
Derwent Registry Numbers: 0247-S; 1741-U
Specific Compound Numbers: R01741-M

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2001 Derwent Info Ltd. All rights reserved.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All	<input type="checkbox"/> Clear Selections	<input type="checkbox"/> Print/Save Selected	<input type="checkbox"/> Send Results	<input type="checkbox"/> Display Selected	Format Full
--	---	--	---------------------------------------	---	-----------------------

© 2001 The Dialog Corporation plc

THIS PAGE BLANK (USPTO)



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Übersetzung der
europäischen Patentschrift

⑧7 EP 0 284 789 B1

⑩ DE 38 84 645 T 2

⑤1 Int. Cl.5:
C08 H 1/06
A 61 K 37/12
A 61 K 9/20
A 61 K 9/02

②1	Deutsches Aktenzeichen:	38 84 645.4
⑧6	Europäisches Aktenzeichen:	88 102 975.5
⑧6	Europäischer Anmeldetag:	29. 2. 88
⑧7	Erstveröffentlichung durch das EPA:	5. 10. 88
⑧7	Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	6. 10. 93
④7	Veröffentlichungstag im Patentblatt:	27. 1. 94

DE 38 84 645 T 2

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1
12.03.87 IT 1965987

⑦3 Patentinhaber:
Istituto Gentili S.p.A., Pisa, IT

⑦4 Vertreter:
Türk, D., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Gille, C., Dipl.-Ing.;
Hrabal, U., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Leifert, E.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 40593
Düsseldorf

⑧4 Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE

⑦2 Erfinder:
Menicagli, Claudio, I-56100 Pisa, IT

⑤4 Verfahren zur Herstellung von Kollagen und daraus erhaltene Produkte.

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 38 84 645 T 2

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Kollagen, ausgehend von tierischen Geweben, sowie das reine und nicht-denaturierte Kollagen, das mit Hilfe dieses Verfahrens erhalten wird.

Kollagen ist der Hauptbestandteil des Bindegewebes und ist das häufigste faserförmige Protein bei höheren Wirbeltieren; in der Natur existiert es als Kette, die in einer Tripelhelix-Konformation angeordnet ist mit sich wiederholender Struktur.

Obwohl wenigstens fünf Haupttypen der Kollagene in der Natur vorkommen, ist als das häufigste das Kollagen vom Typ I zu betrachten, das der Hauptbestandteil der Haut, der Knochen und der Sehnen ist.

Kollagen vom Typ I, das in Sehnen vorhanden ist, hat eine $\alpha_1(I)$ $\alpha_2(I)$ -Kettenkonformation, worin α_1 - und α_2 -Ketten Homologe sind. Elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen sind zwischen den α_1 - und α_2 -Ketten vorhanden, die, zusammen mit dem Vorhandensein von Hydroxyprolin dem Molekül Festigkeit und Beständigkeit verleihen. Das Vorhandensein der genannten Bindungen, die in dem Extrakt beide erhalten bleiben, verhindert die Bildung einer richtigen Lösung, wobei sie bestenfalls in einem sauren Medium die Bildung eines Gels gestatten, infolge der Quellung des Proteins bei Vorhandensein von Wasser.

Kollagen wird gegenwärtig in der Medizin in verschiedenen Anwendungsarten eingesetzt: tatsächlich wird es als Heilmittel in der klinischen Chirurgie verwendet, bei der Behandlung von Verbrennungen, als ein Träger und als eine chirurgische Prothese (Nahtfäden, Gaze usw.), als Implantationsmaterial und als Ausgangsmaterial für Cremes und Salben auf dem pharmazeutischen und kosmetischen Gebiet.

Daraus ergibt sich die Wichtigkeit sich auf ein Kollagen verlassen zu können, das so weit wie möglich nicht-denaturiert, nicht-allergisch und frei von unerwünschten Verunreinigungen oder Kontaminanten ist.

Die bisher bekannten und verwendeten industriellen Verfahren sind in dieser Hinsicht nicht befriedigend, da sie das Erreichen der oben genannten idealen Eigenschaften nicht gestatten.

Beispielsweise offenbart die FR-A-2328786 ein Verfahren zur Extraktion von Kollagen und Einbeziehung einer enzymatischen Proteolyse von Telozeptiden. Das erhaltene Kollagen erfordert eine Vernetzungsstufe für die Herstellung spezieller Formen wie Schwämmchen.

Das Problem ist besonders dringend in den Fällen, wo Kollagen aus Sehnen extrahiert wird, die, wenn sie vom Säure-unlöslichen Typ sind, schwer mit Hilfe des üblichen angewandten Verfahrens extrahiert werden können, das auf Basis der Verwendung von extraktiven Lösungen anorganischer Salze in Essigsäure oder verdünnter Salzsäure erfolgt, wenn proteolytische Enzyme (Papain, Trypsin, Kimotrypsin, Pepsin) nicht vorhanden sind. Obgleich sie die Polypeptidstruktur der α_1 - und α_2 -Ketten nicht schwächen, rufen sie deren Aufdrehung hervor.

Das extrahierte Produkt ist weiterhin im allgemeinen vernetzt, um dessen mechanische Eigenschaften zu erhöhen und zu verbessern, um die Immunisierungskraft herabzusetzen und dessen Beständigkeit gegenüber organischer Re-Adsorption zu erhöhen.

Dieses Vernetzungsverfahren wird im allgemeinen entweder durch einen physikalischen Prozeß durchgeführt (UV-Licht, γ -Strahlen, Röntgenstrahlen, α - oder β -Teilchen, Protonen, Elektronen) oder durch ein chemisches Verfahren (Formaldehyd, Glutaraldehyd, Acetaldehyd, Brenztraubensäurealdehyd, Glyoxal, Amido-dialdehyd, Chinone, Hydrochinone, Dimethylaceton, Dimethylsulfon). Gegebenenfalls wird ein Endprodukt erhalten, das die Struktur von natürlichem Kollagen nicht beibehält.

Ein anderes Problem des Standes der Technik, das bei der Extraktion von sowohl Sehnen als auch Haut üblich ist, besteht in den verlängerten Extraktionszeiten, die durch den dialytischen Reinigungsprozeß erforderlich sind, um die bei der Extraktionsstufe verwendeten Salze zu entfernen.

Das erfindungsgemäße Verfahren gestattet die Nachteile des Standes der Technik zu überwinden und führt zu einem Endprodukt, das hochrein ist und nicht-denaturiert, da die proteolytischen Enzyme oder Vernetzungsmittel nicht verwendet werden, und das ökonomischer ist als jenes, das durch die bisher bekannten Verfahren erhalten wurde.

Das Verfahren der Erfindung ist für die Extraktion von Kollagen aus Rindersehnen geeignet, die leicht verfügbare Materialien darstellen, da sie Nebenprodukte der Nahrungsmittel- und Gerbindustrie darstellen.

Im Falle der Extraktion aus Sehnen wird ein Kollagen vom "Säure-unlöslichen" Typ in Form eines Gels erhalten, das einem Gefriertrocknungsverfahren

unterworfen wird, um spongiöse Tabletten des Typs zu erhalten, wie sie im allgemeinen in der klinischen Chirurgie verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren besteht aus den folgenden Stufen:

- a) Extraktion des biologischen Gewebes mit 0,5 bis 2 M wäßriger Essigsäure;
- b) Ausfällung von Kollagen durch Zusatz anorganischer Salze und Gewinnung des Niederschlages;
- c) Suspendieren des Niederschlages in 0,5 bis 2 M wäßriger Essigsäure und Rühren bis zur Gelbildung;
- d) Wiederholung der vorstehenden Stufen b) und c);
- e) Waschen und gegebenenfalls Konzentrieren in der Lösung oder des Gels durch tangential Filtration durch Membranen mit einer Ausschlußgrenze von 10000 bis 100000;
- f) Lyophilisieren der endgültigen Lösung oder des Gels zur Herstellung spongiöser Tabletten.

Die Stufe a) wird vorzugsweise unter Verwendung von wäßriger Essigsäure durchgeführt mit Konzentrationen im Bereich von 0,5 bis 2 M, vorzugsweise bei einer Temperatur von nicht höher als 25°C in einem Gewichtsverhältnis von biologischem Gewebe : Säure von 0,1 bis 0,01.

In der Stufe b) wird vorzugsweise Natriumchlorid verwendet, während sich bei der Stufe c) Kollagen vom Typ I ergibt, das in Säuren unlöslich ist, und die unter Verwendung von 0,5 bis 2 M wäßriger Essigsäure wiederum durchgeführt wird.

Die Stufe e) besteht aus einer ersten Waschstufe bei einem konstanten Volumen und einer zweiten Konzentrierungsstufe. Die Waschstufe besteht im wesentlichen aus einem tangentialen Filtrationsprozeß durch molekulare Ausschlußmembranen, deren Verwendung gestattet, ein Filtrat, das alle Produkte mit einem Molekulargewicht von weniger als dem molekularem Ausschluß der Membran selbst zu entfernen, unabhängig von deren Natur. Zu gleicher Zeit wird das in der Lösung oder in dem Gel vorhandene Kollagen, das ein Molekulargewicht von höher als dem nominalen molekularen Ausschluß der Membran hat, in der flüssigen Phase zurückgehalten, die mittels einer peristaltischen Pumpe zirkuliert. Somit wird bei Arbeiten mit kontinuierlich erneuerter Essigsäure eine vollständige Entfernung aller in der Startlösung oder dem Startgel vorhandenen Verunreinigungen in kurzer Zeit bewirkt. Die Gel-Konzentrierungsstufe wird durch Rückführung des gleichen Gels durch die tangential Filtrationsvorrichtung durchgeführt.

Da jede Zyklusflüssigkeit durch tangential Filtration entfernt wird, ist die Lösung oder das Gel dementsprechend konzentriert. Das Verfahren ist beendet, wenn der am Manometerröhrchen angezeigte Betriebsdruck dazu tendiert, 275,6

kPa (40 psi) zu überschreiten; unter diesen Bedingungen hat das erhaltene Gel eine Konzentration zwischen 1,5 und 2% erreicht. Im Falle der Lösung (die ausgehend von Haut erhalten wird, die zu einem säurelöslichen Kollagen führt) kann das Ende der Bearbeitung durch Viskositätsmessungen, Hydroxyprolin-Titer usw. angezeigt werden, die der gewünschten Konzentration entsprechen.

Fig. 1 und 2, die in den dazugehörigen Zeichnungen aufgeführt sind, zeigen das Fließbild der oben beschriebenen Bearbeitungsgänge: Fig. 1 ist ein Fließbild des Waschens bei konstantem Volumen, wobei das Bezugszeichen 1 den Vorratsbehälter mit verdünnter Essigsäure darstellt, Bezugszeichen 2 ist die Probe, Bezugszeichen 3 ist die Filtrationsmembran, während die Bezugszeichen 4, 5 und 6 die peristaltische Pumpe bzw. den Waschwasseraustrag bzw. die Probenrückführung darstellen.

In der Praxis kann der Vorratsbehälter 1 durch die gleiche zirkulierende Essigsäure ersetzt werden.

Fig. 2 zeigt das Fließbild der Kollagenkonzentrierung in Form der Lösung oder des Gels, wobei gleiche Bezugszeichen mit den gleichen Elementen von Fig. 1 übereinstimmen. Die höhere Ausschlußgrenze der verwendeten Filtriermembranen beträgt vorzugsweise 10000 bis 100000.

Die Kollagenlösung oder das Kollagen-Gel aus den Stufen a), b) und c) werden auf Konzentrationen von 0,005% bis 0,5% verdünnt während die zum Waschen verwendete verdünnte Essigsäure eine Konzentration von 0,01 bis 1 M hat, vorzugsweise etwa 0,5 M.

Wenn ein mit Substanzen versehenes medizinisches Kollagen erwünscht ist, das eine pharmakologische Wirksamkeit hat, können die genannten Substanzen direkt in dem Vorratsbehälter gelöst oder dispergiert werden nach der Entfernung der Salze bei konstantem Volumen und vor der Konzentrierung.

Zu Beispielen der genannten Substanzen gehören insbesondere Antibiotika, Vitamine, Hormone und Steroide. Zur Verwendung in Gynäkologie ist Zinksulfat besonders bevorzugt für die topische Behandlung von Herpesleiden (Ovula, Cremes, Kompressen usw.).

Die Menge der zu lösenden oder zu dispergierenden Substanz wird auf Basis von Multiplikationsfaktoren berechnet, die für die nachfolgende Konzentrationsstufe von Kollagen-Gel und -lösung erhalten werden sowie möglicherweise auf Basis von Gegebenenfalls-Stufen der Umwandlung des Ausgangsmaterials.

Schließlich wird gegebenenfalls eine Lyophilisierung nach üblichen Verfahrenswegen durchgeführt.

Das nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltene Kollagen behält seine charakteristische Tripelhelix-Konformation, ist rein, erfordert keine Vernetzungsbehandlung und ist nichtallergisch.

Wegen der oben genannten Eigenschaften ist das Kollagen der vorliegenden Erfindung wirksamer bei der Unterstützung des Heilprozesses chirurgischer Wunden und Verbrennungen, gestattet, daß eine natürliche Reparaturwirkung eintritt, die durch die nicht-denaturierte Struktur der erhaltenen Produkte selbst begünstigt wird.

Die vorliegende Erfindung wird weiterhin durch die nicht beschränkenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1

80 g Achillessehne vom Rind wurden von Fett- und Fleischteilen befreit, anschließend abgerieben und unter Verwendung eines Hächslers zerkleinert. Die Masse wurde dreimal mit Wasser gewaschen, dreimal mit einer wäßrigen Natriumchloridlösung mit einer Konzentration von 1 bis 10%, anschließend mit Wasser bis genügend klare Waschflüssigkeiten erhalten wurden. Jede Wäsche wurde durch Abdekantieren der Flüssigkeit ausgeführt.

Das Material wurde in verdünnter Essigsäure mit einer Konzentration von 0,5 bis 2 M verdünnt, in einer solchen Menge, so daß sich ein Verhältnis von organischem Material zu Säure im Bereich von 0,1 bis 0,01 ergab. Das Material wurde unter schwachem konstantem Rühren für 24 bis 72 Stunden bei einer Temperatur von nicht höher als 25°C gehalten.

Das Material wurde durch ein 300 µm Metallsieb (n. 50) filtriert, wobei die flüssige Phase gesammelt wurde und die Feststoffe zurückgeführt wurden. Natriumchlorid wurde in einer Menge von 250 bis 1000 g zu der flüssigen Phase hinzugegeben: Kollagen fiel in Form eines gummfädigen Produktes mit milchig-weißer Farbe aus, das mittels Filtration durch ein 425 µm Metallsieb (n. 40) abgetrennt wurde, mit reichlich destilliertem Wasser gewaschen und wiedergewonnen wurde. Die Feststoffe wurden nochmals in verdünnter Essigsäure nach den oben beschriebenen Verfahrensweisen suspendiert und nochmals extrahiert. Die Operationen wurden wiederholt, bis eine klare Abtrennung von Kollagen erhalten wurde (etwa drei- bis viermal).

Das gesamte erhaltene Kollagen wurde in 5 l 0,5 M Essigsäure suspendiert und unter konstantem Rühren gehalten bis zur vollständigen Gelierung (etwa 24 Stunden). 500 g Natriumchlorid wurden hinzugegeben, um Kollagen auszufüllen, das dann über ein 425 µm Metallsieb (n. 40) abfiltriert wurde. Der Feststoff wurde gewonnen, mittels Dekantieren mit fünf Portionen destilliertem Wasser (jeweils 1 l) gewaschen, anschließend in 0,5 l 0,5 m Essigsäure suspendiert und bis zur vollständigen Gelierung gerührt (etwa 24 Stunden). Durch anschließende Verdünnung mit der gleichen Säure wurden 0,75 kg 1% Kollagen-Gel (Hydroxyprolin, Titer x 7,46) gewonnen.

Das Gel wurde quantitativ in 71/91 cm (28/32 Zoll) Dialysemembranen

übertragen und mit 0,5 M Essigsäure dialysiert, die kontinuierlich erneuert wurde bis das Natriumchlorid vollständig aus dem Gel entfernt war.

Das Kollagen-Gel wurde in quadratische Schalen eingebracht unter Verwendung einer Oberflächenwalze, um die sehr viskose Masse genau zu verteilen.

Die Masse wurde bei etwa -40°C für 8 bis 10 Stunden vorgetrocknet, für 16 Stunden einem Hochvakuum ($6,66 \text{ Pa} = 0,05 \text{ mmHg}$ Restdruck) ausgesetzt, und anschließend wurde die Temperatur mit konstanter Geschwindigkeit (etwa $2^{\circ}\text{C}/\text{Stunde}$) erhöht, bis das Produkt 30°C erreichte.

Das Material wurde schließlich auf 40°C für 2 Stunden erhitzt, der lyophilisierte Film abgekühlt und mittels einer halbmanuellen Schere zerteilt.

Das erhaltene Produkt hatte die folgenden Eigenschaften und konstanten chemisch-physikalischen Parameter.

Chemische Parameter

- a) Hydroxyprolingehalt, spektrofotometrisch bestimmt, mehr als 13 % und jedenfalls nicht weniger als 12 %.
- b) Gesamt-Stickstoffgehalt, bestimmt nach dem Kjeldhal-Verfahren, höher als 17,5 % und jedenfalls nicht weniger 16,2 %.
- c) Restfeuchtigkeitsgehalt weniger als 20 %.

Physikalische Parameter

- a) Eintauchzeit pro Gewichtseinheit nicht weniger als 15 Minuten.
- b) Wasserabsorptions-Koeffizient pro Gewichtseinheit nicht weniger als 25 g.
- c) Einreißfestigkeit nicht weniger als 2000 g/cm^2 .
- d) Kräuselttemperatur von 90 bis 120°C .
- e) Pepsin-Verdauzeit in N/10 HCl (1/1 Gewichtsverhältnis) nicht weniger als 20 Minuten.

Beispiel 2

Das in dem obigem Beispiel vor der Dialyse erhaltene Gel wurde in drei Teilmengen eingeteilt und mit 0,5 M Essigsäure verdünnt, um zu Konzentrationen von 0,1, 0,2 und 0,3 Gewichts-% zu gelangen.

Anschließend wurde das Aussalzen durchgeführt entsprechend den Fließbildern der Figuren 1 und 2 unter Verwendung von 0,5 M Essigsäure und einer Membran mit einer Ausschlußgrenze von 30000.

Die typische Verfahrensweise für 1 Liter Kollagen-Gel der Konzentrationen 0,1, 0,2 und 0,3 % ist in Fig. 3 dargestellt, wobei die prozentuale Salzgehaltsänderung in der filtrierten Flüssigkeit gegenüber der Zeit dargestellt ist. Die Probe hatte eine 100 %ige Reinheit, wenn 100 % des filtrierten Salzgehaltes erreicht waren.

Das beschriebene Verfahren bezieht sich auf ein Kollagen-Gel mit einer Konzentration von 0,1, 0,2 und 0,3 %, das Natriumchlorid enthält, es kann jedoch

auch eine beliebige Salzverunreinigung in Kollagen-Gel oder -Lösung angewandt werden, wie in Fig. 3 als prozentuales Aussalzen gegenüber der Zeit dargestellt. Darüber hinaus können die oben festgestellten Grundprinzipien gegenüber verschiedenen Konzentrationen angewandt werden, wobei natürlich die charakteristischen Kurven des Verfahrens sich von Fall zu Fall verändern werden.

Fig. 4 zeigt den Ablauf der Konzentrierungsstufe für Kollagen-Gel mit einer unterschiedlichen Konzentration (0,1, 0,2 und 0,3 %).

Das Grundprinzip des Verfahrens kann auf Kollagen-Gele oder -Lösungen unterschiedlicher Konzentration auch in diesem Fall angewandt werden. Das Verfahren ist beendet, wenn die Kollagenkonzentration (Hydroxyprolin-Titer x 7,46) den gewünschten Wert erreicht.

Die Regenerierung der Filtriermembranen wird mit 0,5 M Essigsäure durchgeführt. Es sollte darauf hingewiesen werden, daß der charakteristische Verlauf der Kurven, wie in Fig.4 dargestellt und allgemeiner noch des Verfahrens, auch durch die Menge der Ausgangsprobe beeinflusst wird.

1

88 102 975.5 / 0 284 789

ISTITUTO GENTILI S.p.A.

5

Deutsche Übersetzung der Patentansprüche für die Vertragsstaaten:
BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE, AT, ES, GR.

10

1. Verfahren zur Herstellung von nicht-denaturiertem Kollagen aus Rindersehnen, das folgende Stufen umfaßt:

15

- a) die Extraktion des biologischen Gewebes mit 0,5 bis 2 M wäßriger Essigsäure;
- b) die Ausfällung des Kollagens durch Zusatz anorganischer Salze und die Gewinnung der Ausfällung;
- c) das Suspendieren der Ausfällung in 0,5 bis 2 M wäßriger Essigsäure und Rühren bis zur Gelbildung;
- d) die Wiederholung der vorstehend Stufen b) und c);
- e) das Waschen und gegebenenfalls Konzentrieren der Lösung oder des Gels durch tangentielle Filtration durch Membranen mit einer Ausschlußgrenze von 10000 bis 100000;
- f) das Lyophilisieren von endgültiger Lösung oder Gel zur Herstellung schwammartiger Tabletten.

20

25

2. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem wäßrige Essigsäure mit Konzentrationen von 0,5 bis 2 M in der Stufe a), bei einem Gewichtsverhältnis von Gewebe zu Säure im Bereich von 0,1 bis 0,01 verwendet wird.

30

3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die tangentielle Filtration kontinuierlich unter Verwendung von Kollagen-Lösungen oder -Gels mit Konzentrationen von 0,005 % bis 0,5 % und Wäsche mit Essigsäure von 0,01 bis 1 M, vorzugsweise etwa 0,5 M durchgeführt wird.

35

4. Schwammartige Tabletten von lyophilisiertem Kollagen aus Rindersehnen, die gegebenenfalls andere Verbindungen mit pharmakologischer

1

Wirksamkeit enthalten, erhalten durch das Verfahren der Ansprüche 1 - 3.

5

5. Tabletten nach Anspruch 4, die Zinksulfat enthalten, zur Verwendung in der Gynäkologie.

10

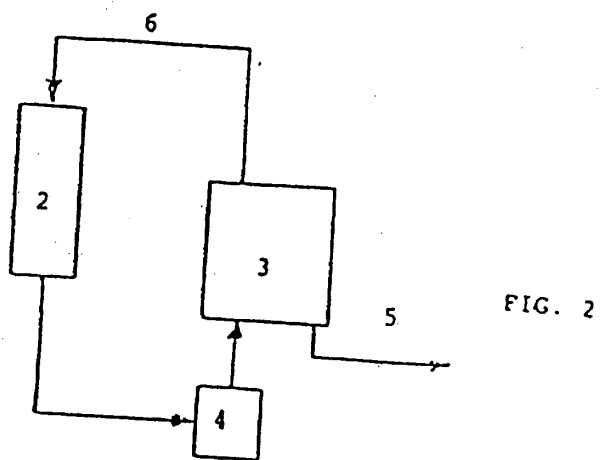
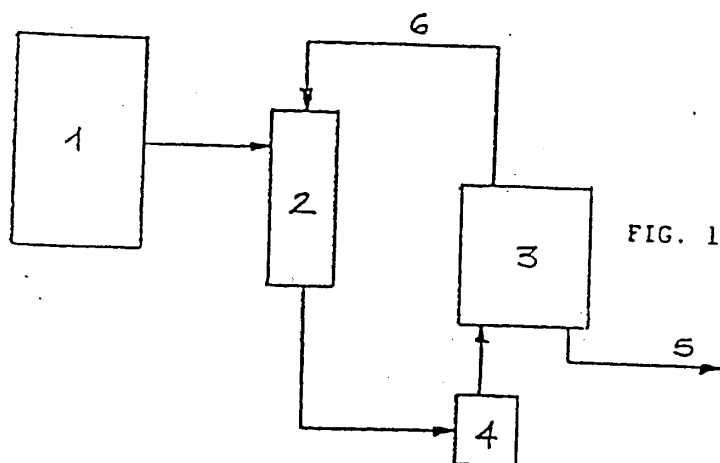
15

20

25

30

35



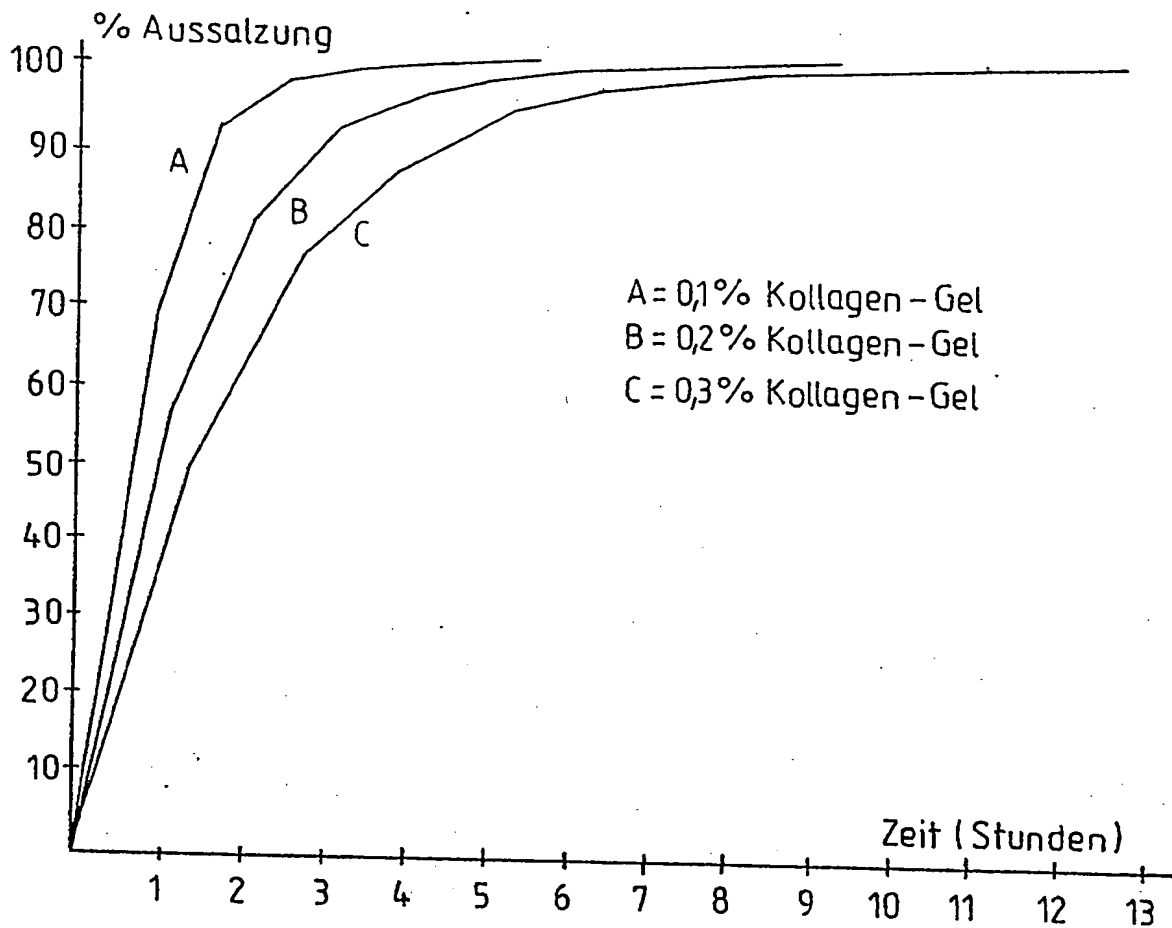


Fig. 3 Fortschreiten der Aussalzung über die Zeit vs Kollagen-Gel mit den Konzentrationen 0,1 , 0,2 und 0,3 %

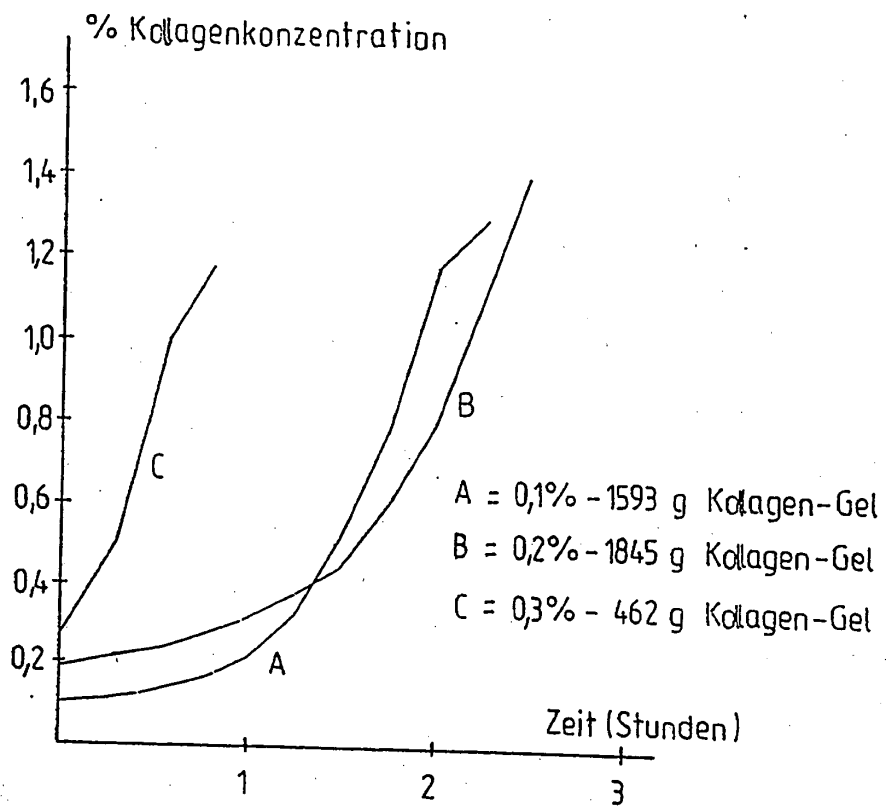


Fig. 4 Fortschreiten der Konzentration über die Zeit vs Kollagen-Gel mit den Ausgangskonzentrationen 0,1, 0,2 und 0,3 %

THIS PAGE BLANK (USPTO)